

JP-A-7-51080

published on February 28, 1995

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-51080

(43) 公開日 平成7年(1995)2月28日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 19/04	A	7432-4B		
C 0 8 B 37/00	C	7433-4C		
	P	7433-4C		

// (C 1 2 P 19/04
C 1 2 R 1:645)

審査請求 未請求 請求項の数3 F D (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平5-222290

(22) 出願日 平成5年(1993)8月12日

(71) 出願人 000004101

日本合成化学工業株式会社

大阪府大阪市北区野崎町9番6号

(72) 発明者 山 上 知 秀

枚方市香里ヶ丘8-12-2

(72) 発明者 酒 井 紀 人

兵庫県多紀郡南町南矢代1071

(72) 発明者 福 嶋 信 浩

枚方市香里ヶ丘8-31-1

(54) 【発明の名称】 β -1, 3-グルカンの製造法

(57) 【要約】

【目的】 本発明は、品質の良い β -1, 3-グルカンを生産させ、更に生産性も向上させること目的とする。

【構成】 糖類、窒素化合物を含有する水性培地中で、オーレオバシディウム属に属する微生物を好氣的発酵により培養するに当たり、培養中の水性培地のpHを4.5~6.5の範囲に制御する β -1, 3-グルカンの製造法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 糖類、窒素化合物を含有する水性培地中で、オーレオバシディウム属に属する微生物を好氣的発酵により培養するに当たり、培養中の水性培地のpHを4.5～6.5の範囲に制御することを特徴とするβ-1, 3-グルカンの製造法。

【請求項2】 前記水性培地のpHの制御範囲において、pHの最大値と最小値の差を1以内に制御することを特徴とする請求項1記載のβ-1, 3-グルカンの製造法。

【請求項3】 前記水性培地のpHの制御範囲において、pHを5.0～6.0の範囲に制御することを特徴とする請求項1又は2記載のβ-1, 3-グルカンの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、オーレオバシディウム属(Aureobasidium)に属する微生物を用いたβ-1, 3-グルカンの製造法に関し、更に詳しくは、培養中の水性培地のpHを4.5～6.5の範囲に制御するβ-1, 3-グルカンの製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】微生物多糖には、β-1, 3-グルカン、キサンタンガム、ブルラン、レバン等様々な多糖があり、これら多糖は食品工業、化粧品工業、医薬品工業、製紙工業、化学工業等多方面に渡って使用されている。この中でも微生物発酵により得られるβ-1, 3-グルカンは、特に乳化安定性、生理活性、増粘効果、凝集性等多くの優れた機能を保持しており、又pH、温度等の環境の変化に対しても安定な物性を有していることから産業上幅広い用途に期待されている。

【0003】該β-1, 3-グルカンはオーレオバシディウム属に属する微生物の好氣的発酵により生産される微生物多糖であり、その製造法に当たっては炭素源としてグルコース、フルクトースのような単糖類、あるいはシュクロースのような二糖類等が用いられ、窒素源としてはペプトンや酵母エキスの有機窒素源、硝酸ナトリウムや硝酸アンモニウムのような無機窒素源、又無機塩類としてマグネシウムやカリウム、硫酸、鉄等各イオンの塩が利用され、又必要であれば多糖生産促進剤としてアスコルビン酸等も添加され、β-1, 3-グルカンが得られる。(アグリカルチュラル バイオロジカル ケミストリー(Agri. Biol. Chem.), 47(6)1167(1983))。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、オーレオバシディウム属に属する微生物を上記培地のままで培養する際、培養中の培地のpHが大きく変動し、特に菌体の増殖にともないpH値は上昇し培養液表面に大量の泡が発生し、培養液の損失や異常培養等を起こしてしま

い、更に菌体の対数増殖期が終了し静止期に近づくと逆にpH値の低下が起こり始めpH3程度まで下降する傾向があり、このような低pH域では菌体の異化代謝による培養液、及びβ-1, 3-グルカンの着色が起こる等の問題があり、培地のpHを制御しない培養系では常に良品のβ-1, 3-グルカンを製造することができず、又生産性についても充分なものではなかった。

【0005】又、特開昭55-37188号、特開平3-2202号等に示されるように、培養条件にpH値の範囲を定めた事例もあるが、これらは培養初期のpH値の設定のみであり、培養中のpH値を積極的に制御することはなされておらず、該方法をβ-1, 3-グルカンの製造に利用しても上記と同じ問題点が残る。そこで、これら課題を解決したβ-1, 3-グルカンの製造法が強く望まれている。

【0006】

【課題を解決するための手段】しかるに本発明者等はいかかる課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、オーレオバシディウム属に属する微生物を好氣的発酵により培養するに当たり培養中の水性培地のpHを4.5～6.5の範囲に制御することで、生産性の高い、良品のβ-1, 3-グルカンを製造することができることを見出し、本発明を完成した。以下、本発明について具体的に説明する。

【0007】本発明においてβ-1, 3-グルカンを主鎖とする多糖を生産するオーレオバシディウム属に属する微生物としては、工業技術院微生物工業技術研究所に微工研菌寄第12989号(FERM P-12989)で寄託されているオーレオバシディウム sp. K-1が挙げられる。

【0008】本発明においてβ-1, 3-グルカンは、次のようにして得ることができる。即ち、炭素源としてシュクロース、グルコース又はフラクトース、窒素源として硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム等の無機化合物、あるいは酵母エキス、ペプトン等の有機天然窒素源、更に必要に応じてマグネシウム、鉄等の金属イオンやアスコルビン酸、パントテン酸等のビタミン類を添加した培地で、更に該培地のpHを4.5～6.5、好ましくは該範囲内でpHの最大値と最小値の差が1以内、更に好ましくは5.0～6.0の範囲に終始制御し、10℃～60℃、好ましくは25℃～35℃にて1日～10日間、好ましくは2日～6日間オーレオバシディウム属に属する微生物を通気培養することによりβ-1, 3-グルカンを主鎖とする多糖を含有する培養液を得る。又、上記方法で得られた菌体を集菌した後洗浄して調製した洗浄菌体を用い、これを炭素源と接触させることによっても当該多糖を得ることができる。

【0009】更に本発明で得られるβ-1, 3-グルカンを主鎖とする多糖は、上記方法で得られる培養液をそのまま種々の用途に用いることも可能であるが、分離精

製して用いても良い。培養液からの当該多糖の分離は、遠心分離沈降法あるいはセライト等の担体を用いた濾過法によって菌体を除去し、得られた清澄液にメタノール、エタノール、イソプロピルアルコール等の溶媒、あるいは銅、アルミニウム等の金属イオンを適量添加して沈降せしめドラムドライヤー等乾燥装置を用いて乾燥し、ハンマーミル、ボールミル等で粉碎し、粉末体を得ることにより行うことができる。

【0010】ここで本発明の培地のpHを上記範囲内に制御するに当たっては、酸とアルカリが用いられ、酸としては硫酸、塩酸、リン酸等の鉱酸類、あるいは酢酸、クエン酸、リンゴ酸等の有機酸類が挙げられ、アルカリとしては水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等の各種水酸化物が挙げられるが、いずれの場合もこれらに限られることはない。又酸、アルカリの各溶液の濃度は適宜調整されるが、特に0.01~5N、好ましくは0.5~2Nに調整され用いられることが望ましい。更に酸、アルカリの各溶液の添加量や添加方法についても特に限定されることなく、該pHの範囲内で適宜適当量を添加すればよい。又、添加装置には一般的なpHセンサー連動型の装置を用いていれば特に限定されない。

【0011】本発明では、特にβ-1, 3-グルカンの中でもイオウ含有基を有するものが好適に製造可能であり、該β-1, 3-グルカンを経由しては前述の培養条件に加えて硫酸マグネシウム・7水和物、硫酸第一鉄*

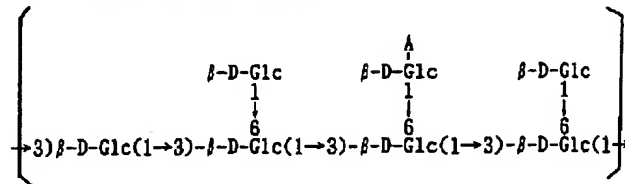
*・7水和物等を添加する必要がある。

【0012】かかる方法で得られるβ-1, 3-グルカンとは、オーレオバンディウム sp. K-1 (FERM P-12989) により生産されるものであり、主に化1で示される構造単位と化2で示される構造単位とからなるものであり(1分子中の双方の構造単位数の合計は1000~2000である。)、主鎖のグルコースにβ-1, 6結合したグルコースの分岐をもち、好ましくはかつイオウ含有基を有する分岐β-1, 3-グルカンである。更に詳しくは、主鎖のグルコース4個あたり3個がβ-1, 6結合したグルコースの分岐をもち、イオウ含有基が多糖に対して0.1~1.0重量%結合したβ-1, 3-グルカンが主である。本発明におけるイオウ含有基とはスルホ酢酸基、スルホン酸基、ポリスルホン酸基、システイン、シスチン、メチオニン等を示す。

【0013】かかる多糖の化学的、物理的性質及び構造の解析法においては科学と工業64(3)、131~135(1990)及びアグリカルチュラバイオロジカルケミストリー(Agri. Biol. Chem.)、47(6)1167~1172(1983)に詳細に述べられている通りである。

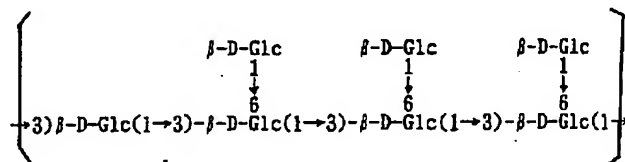
【0014】

【化1】



【0015】

※ ※ 【化2】



【但し、Glcはグルコース、Aはスルホ酢酸基、スルホン酸基、ポリスルホン酸基、システイン、シスチン又はメチオニン等のイオウ含有基を表す。】

【0016】このような該β-1, 3-グルカンは、先にも述べたように温度、pH等に対する安定性、乳化安定性、生理活性、増粘効果、凝集性等優れた機能を有し、工業関係、農業関係、塗料関係、洗浄関係、土木関係等様々な所で多種多様な用途に用いることができる。

【0017】しかるに本発明の製造法は、構造、化学的性質、物理的性質等従来のものと全く変わりのないβ-1, 3-グルカンを品質良く生産することができ、更に生産速度も向上し生産性の面でも優れた効果を示す。

【0018】

【作用】本発明の製造法は、従来問題とされていたpHの上昇による発泡現象、pHの低下により生じる菌体の異化代謝に由来する培養液やβ-1, 3-グルカンの着色を軽減することができたことで、良品質のβ-1, 3-グルカンを得ることができ、更にβ-1, 3-グルカンの生産性をも向上させることができた。

【0019】

【実施例】以下、本発明について実施例を挙げて具体的に説明する。尚、実施例中「%」とあるのは特に断りのない限り重量基準である。

50 実施例1

シュクロース3%、硝酸ナトリウム0.2%、リン酸水素2カリウム0.1%、塩化カリウム0.05%、硫酸マグネシウム・7水和物0.5%、硫酸第一鉄・7水和物0.001%、アスコルビン酸ナトリウム0.3%の培地組成を水に溶解し、該pHを5.5に調整後、500ml容坂口フラスコに100ml添加し、これを120℃で20分間滅菌した。これにオーレオパシディウム

sp. K-1 (FERM P-12989) の同培地懸濁液を1ml植菌し、27℃、120回転/分で3日間往復振盪培養したものを種菌とし、これを前述のフラスコ培地同様に調製した8l仕込みの10l培養槽に無菌的に100ml接種し、温度27℃、通気量6l/分、回転数200回転/分で4日間培養を行った。

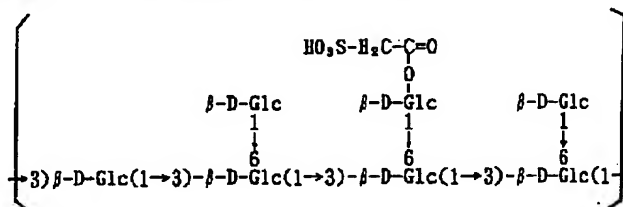
【0020】培養中の培地のpHは東京理化学機(株)製のpH制御自動滴定装置により、酸として1N硫酸水溶液、アルカリとして1N水酸化ナトリウムを用いて、*

*終始5.5～6.0の範囲内に制御した。培養終了後、これに水で5倍に希釈して遠心分離を行い完全に菌体を除去した後、イソプロパノール及びアセトンで抽出操作を繰り返し行い、析出した結晶を70℃で乾燥し、本多糖を白色の繊維状結晶として得た。

【0021】この多糖を常法により(科学と工業、64(3)、131～135(1990)及びアグリカルチュラル バイオロジカル ケミストリー (Agric. Biol. Chem., 47(6)1167～1172(1983)参照)分析したところ、その構造は化3で表される構造単位及び化4で表される構造単位からなることがわかった。イオウ含有量は多糖全体に対して0.05重量%であり、1分子中の双方の構造単位数の合計は約1500であった。

【0022】

【化3】

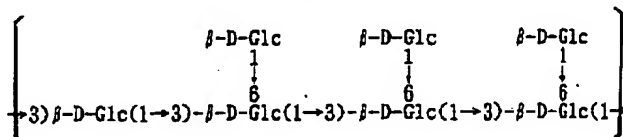


【但し、Glcはグルコースを表す。】

※【化4】

【0023】

※



【但し、Glcはグルコースを表す。】

【0024】尚、評価は培地のpH値の経時変化、菌体の量を示すのに用いられるOD値(610nmの光を照射)の経時変化、β-1,3-グルカンの生成量(培養終了後、固形分を除去した培養液1l当たりに含まれるβ-1,3-グルカンの重量(g)で示す。)についての経時変化、発泡による培養液の損失量(8l仕込みでの損失量(ml))、及び得られたβ-1,3-グルカンの着色について行った。

【0025】実施例2

実施例1において、培養中の培地のpHを終始5.0～6.0の範囲内に制御した以外は同様の方法で行い、白色の本多糖を得た。尚、評価についても実施例1と同様に行った。

【0026】比較例1

実施例1において、培養中の培地のpHを制御しなかった以外は同様の方法で行い、黄土色の本多糖を得た。尚、評価についても実施例1と同様に行った。

【0027】比較例2

実施例1において、培地のpH初期値を5.0に調整し、培養中の培地のpHを終始3.5～5.0の範囲内に制御した以外は同様の方法で行い、黄土色の本多糖を得た。尚、評価についても実施例1と同様に行った。

【0028】比較例3

実施例1において、培地のpH初期値を6.0に調整し、培養中の培地のpHを終始6.0～7.0の範囲内に制御した以外は同様の方法で行い、淡黄色の本多糖を得た。尚、評価についても実施例1と同様に行った。

【0029】比較例4

実施例1において、培養中の培地のpHを終始3.5～7.0の範囲内に制御した以外は同様の方法で行い、黄土色の本多糖を得た。尚、評価についても実施例1と同様に行った。表1に実施例、表2に比較例の経時変化や評価結果をまとめて示す。

【0030】

【表1】

	7					8
	培養時間 (hr)	培地の pH値	OD値 (610nm)	グルカンの 生成量 (g/l)	発泡による 培養液の 損失量 (ml)	着色度
実施例 1	0	5.5			0	白色
	24	5.9	1.2	0.2		
	48	5.6	3.3	1.2		
	72	5.5	5.3	2.3		
	96	5.5	7.2	3.5		
実施例 2	0	5.5			0	白色
	24	5.9	1.3	0.2		
	48	5.6	3.3	1.2		
	72	5.0	5.5	2.1		
	96	5.0	7.6	3.0		

【0031】

			* * 【表2】			
	培養時間 (hr)	培地の pH値	OD値 (610nm)	グルカンの 生成量 (g/l)	発泡による 培養液の 損失量 (ml)	着色度
比較例 1	0	5.5			1500	黄土色
	24	6.5	1.5	0.2		
	48	7.2	4.2	0.5		
	72	5.2	7.9	0.9		
	96	3.3	10.1	1.2		
比較例 2	0	5.0			0	白色
	24	5.0	0.9	0.1		
	48	5.0	2.8	0.6		
	72	5.0	3.9	1.1		
	96	3.5	4.8	1.4		
比較例 3	0	6.0			1000	淡黄色
	24	6.0	1.6	0.2		
	48	7.0	4.1	1.9		
	72	6.8	7.2	1.3		
	96	6.0	8.9	1.8		
比較例 4	0	5.5			1500	黄土色
	24	6.5	1.5	0.2		
	48	7.0	4.1	0.7		
	72	5.0	7.6	1.2		
	96	3.5	9.5	1.8		

【0032】

【発明の効果】本発明におけるβ-1, 3-グルカンの製造法は、良品質のβ-1, 3-グルカンを生産するこ 40

とができ、更に生産速度も向上し生産性の面でも優れた効果を示す。